

**PENGARUH KONSENTRASI CELITE (DIATOM) TERHADAP HASIL
ISOLASI DNA BAKTERI *Escherichia coli***

***THE INFLUENCE OF CELITE (DIATOM) CONCENTRATION TOWARD
THE CONCENTRATION RESULT OF DNA GENOM
BACTERIA *Escherichia coli****

**Marlina Ummas Genisa¹⁾, Rosana Agus²⁾, Mohc. Hatta³⁾,
dan Zaraswati Dwiyanita²⁾**

¹⁾FKIP Biologi Universitas Muhammadiyah Palembang

²⁾Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin Makassar

³⁾Laboratorium Biologi Molekular Fak. Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar

Email: linagenisa@yahoo.com

Registrasi: 20 Maret 2015; Diterima setelah perbaikan: 16 April 2015;

Disetujui terbit: 15 Juni 2015

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi *celite* (diatom) yang tepat dalam isolasi DNA bakteri *Escherichia coli*, sehingga diperoleh DNA Genom dengan konsentrasi tinggi. Metode yang digunakan yaitu metode Boom. Dalam penelitian ini menggunakan tiga variasi konsentrasi *celite*, yaitu 10 µl, 20 µl, 30 µl dan kontrol tanpa *celite*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara kualitas (hasil elektroforesis) konsentrasi *celite* 20 µl dan 30 µl memperlihatkan pita DNA yang lebih tebal dan jelas. Nilai konsentrasi DNA bakteri *Escherichia coli* dari konsentrasi *celite* 10 µl, 20 µl, dan 30 µl berturut-turut adalah 0,032 µg/µl, 0,075 µg/µl, dan 0,042 µg/µl. Kontrol tanpa *celite* 0,009 µg/µl. Angka tersebut menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi *celite* 20 µl pada sampel memiliki konsentrasi DNA yang paling tinggi (0,075 µg/µl) dibanding dengan konsentrasi lain dan kontrol tanpa *celite*.

KATA KUNCI: *Escherichia coli*, isolasi DNA genom, konsentrasi *celite*.

ABSTRACT

A research about the influence of "celite" concentration toward the concentration result of DNA Genom Bacteria Escherichia coli. The aim of this research is to determine the appropriate celite concentration in isolating DNA. This research use three kinds of celite concentration, i.e. 10 µl, 20 µl, 30 µl and another concentration without celite as control. In terms of quality (based on the result of electrophoresis), the result indicates that celite concentration 20 µl and 30 µl shows the thick and clear DNA band. Hence, in terms of quantity (spectrofotometer), the result shows that the celite concentration 20 µl has a high DNA concentration of 0,075 µg/µl.

KEYWORDS: *Celite concentration, DNA genom isolation, Escherichia coli.*

1. PENDAHULUAN

Diatom adalah jasad renik bersel satu yang dikenal dengan nama ganggang (algae) dan merupakan suatu jenis tumbuhan air, serta tergolong ke dalam kelas Bacillariophyceae dan ordo Bacillariales. Diatom hidup dalam air tawar, air laut dan di atas tanah yang basah, dengan terpisah atau membentuk koloni. Fosil diatom yang hidup di atas tanah sering disebut tanah diatom yang merupakan senyawa mineral yang terjadi secara alami yang terbentuk dari sisa atau fosil kerangka silika dari suatu jenis tumbuhan air seperti algae (ganggang). Sedimentasi kerangka ini menumpuk selama berabad-abad sehingga terkadang mencapai ketebalan beratus-ratus meter (Gembong, 1989; Matovic, 2007). Dalam perdagangan sering dipakai nama-nama yang berbeda seperti: *celite*, *filtercal*, *calatom* dan *pakatome*.

Bentuk sel diatom bermacam-macam, namun bentuk dasarnya yaitu bilateral dan sentrik. Dinding sel mempunyai susunan khusus yang berpori-pori, terdiri atas pektin dengan suatu panser yang terdiri atas kersik di sebelah luarnya. Menurut Lefond (1975), bahwa tanah diatom juga terbentuk dari fosil tumbuhan air yang unisellular yang kemudian membentuk lumpur diatom yang terdiri dari silika diatom dengan sebuah bentuk dan variasi opal.

Diatom adalah salah satu jenis mineral opal ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), n berarti mengandung jumlah air yang berubah-ubah. Opal merupakan suatu mineral biasa dan jenisnya bermacam-macam. Jenis-jenis dari opal ini adalah opal mulia, opal api, opal susu, opal biasa atau semi opal, batu opal, hialite, geyseritw, diatom dan lain-lain (Manurung, 1994).

Peranan diatom dapat digunakan sebagai penyaring atau sebagai bahan pemutih, bahan isolasi panas dan bunyi, bahan pengisi, bahan gosok untuk logam, bahan bangunan ringan, dan adsorben. Selain fungsi tersebut, diatom memiliki kemampuan daya serap yang tinggi dan digunakan sebagai pembawa larutan sulfida untuk pupuk buatan. Kemampuan daya serap yang tinggi tersebut juga dapat digunakan dalam proses isolasi DNA untuk mengikat DNA ke dalam pori-pori diatom.

Pada saat sekarang ini, DNA sangat menarik perhatian peneliti terutama para biologiwan, karena sangat erat kaitannya dengan hampir seluruh aktivitas biologi. DNA merupakan persenyawaan kimia paling penting pada makhluk hidup yang membawa materi genetik dari satu generasi ke generasi berikutnya.

Berdasarkan hal tersebut, maka diperlukan penelitian untuk mengetahui kemampuan *Celite* (Diatom) dalam mengikat DNA bakteri *Escherichia coli* selama proses isolasi dengan berbagai variasi konsentrasi sehingga dapat digunakan untuk memperoleh DNA genom dengan konsentrasi tinggi.

2. BAHAN DAN METODE

Peralatan dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat dan bahan untuk kultur *Escherichia coli*, isolasi DNA, elektroforesis dan pengukuran konsentrasi DNA. Tahapan penelitian untuk isolasi DNA *Escherichia coli* dilakukan sebagai berikut:

Kultur *Escherichia coli*

Dilakukan dalam medium Luria Bertani yang terdiri dari Trypton, Ekstrak ragi, dan NaCl (Brown, 1991).

Selanjutnya diinkubasi selama 1x 24 jam.

Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA *Escherichia coli* dilakukan dengan metode Boom. Ke dalam 100 µl sampel *Escherichia coli* dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang berisi 900 µl larutan L6 yang mengandung 120 gram Guanidium thiocyanate (GuSCN) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) dalam 100 mL 0.1 M Tris HCl, pH 6.4; 22 mL 0.2 M Ethylen Diamine Tetra Acetat (EDTA) pH 8.0 dan 2.6 gram Triton X-100 (Packard, Instrumens) dengan konsentrasi akhir 50 mM Tris HCl, 5 M GuSCN, 20 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, selanjutnya dihomogenkan semalam. Ditambahkan celite dengan 3 variasi konsentrasi, yaitu 10 µl, 20 µl, 30 µl dan kontrol tanpa celite, yang divariasikan 30 µL (suspensi diatom terdiri dari 50ml H₂O dan 500 µl dari 32 % (w/v) celite (diatom) (Jansen Chimica, Beerse, Belgium). Campuran divortex dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 detik dan diambil sedimennya untuk ditambahkan larutan L2 (terdiri dari 120 gram GuSCN dalam 100 mL 0.1 M Tris HCl, pH 6.4) sebanyak 100 µL. Selanjutnya campuran divortex dan disentrifus kecepatan 12.000 rpm selama 20 detik. Penambahan L2 dilakukan 2 kali. Setelah disentrifus maka supernatant dibuang dan sedimen ditambahkan 60 µL larutan etanol. Selanjutnya divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 20 detik, penambahan etanol dilakukan sebanyak 2 kali, dilanjutkan dengan penambahan aseton.

Pelet yang diperoleh dikeringkan di dalam oven pada suhu 56° C sampai berbentuk bubuk, dan ditambahkan 60 µL buffer TE kemudian divortex dan

dilanjutkan sentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dan supernatan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf yang baru. DNA akan diperoleh dari supernatan ini dan disimpan pada suhu 20° C sebelum dilakukan Elektroforesis dan pengukuran konsentrasi DNA.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

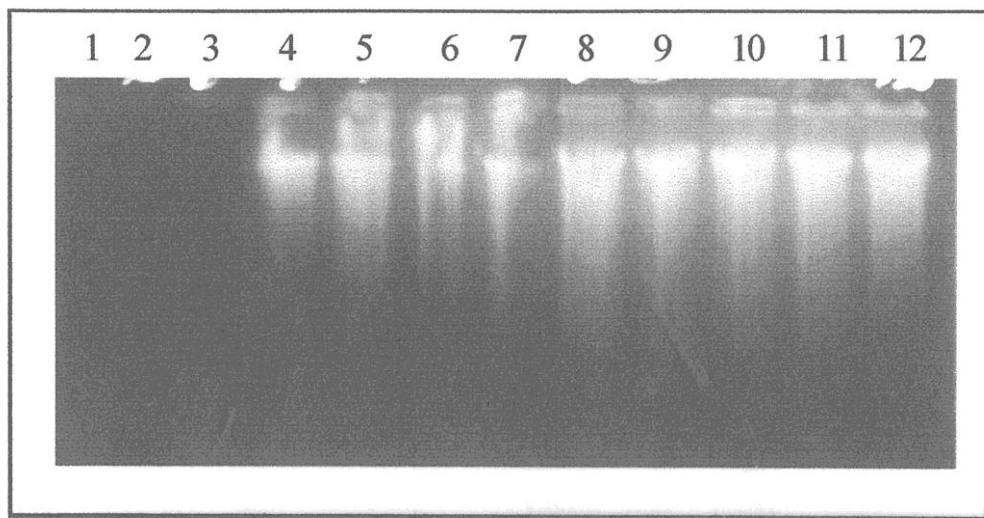
Isolat Bakteri

Pada penelitian ini isolat *Escherichia coli* dikultur dalam medium Luria Bertani (LB). Medium LB merupakan medium kompleks undefined yang komponen-komponen tepatnya tidak diketahui. Trypton dan ekstrak ragi menyediakan kebutuhan nitrogen, gula serta nutrien organik dan anorganik. Medium tertentu harus digunakan bila bakteri perlu ditumbuhkan dalam kondisi yang dikontrol secara tepat, meskipun demikian hal ini tidak diperlukan bila kultur yang ditumbuhkan semata-mata hanya digunakan sebagai sumber DNA (Brown, 1991).

Isolasi DNA Genom *Escherichia coli*

Berbagai macam teknik dapat dilakukan untuk mengisolasi DNA. Isolasi DNA pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan teknik Boom yang diperkenalkan oleh Boom *et.al* (1990). Metode ini berdasarkan proses lisis dari sel dan menginaktifkan sifat nuklease dengan agen *chaotropic* yaitu guanidium thiocynate (GuSCN). Selanjutnya asam nukleat akan bergabung dengan partikel silika atau diatom yang terdapat dalam reagen tersebut. Diatom merupakan bahan yang mengikat DNA dan berasal dari fosil dinding sel alga uniseluler. Hasil elektroforesis isolasi DNA *Escherichia coli* dengan 3 macam variasi

konsentrasi *celite* disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis isolasi DNA *Escherichia coli*; No 1-3 kontrol (tanpa *celite*; No 4-6 konsentrasi *celite* 10 µl, No 7-9 konsentrasi *celite* 20 µl; No 10-12 konsentrasi *celite* 30 µl

Dari hasil elektroforesis (Gambar 1) terlihat adanya pita DNA pada konsentrasi *celite* 10 µl, 20 µl dan 30 µl. Namun demikian, pita DNA pada konsentrasi *celite* 10 µl terlihat tipis dan smear. Hal ini disebabkan DNA yang masih terdapat dalam sampel tidak seluruhnya terikat pada *celite*, karena *celite* yang ditambahkan tidak sebanding dengan jumlah DNA yang akan ditampung. Pada konsentrasi 20 µl dan 30 µl pita DNA terlihat lebih tebal dan lebih jelas yang menunjukkan bahwa ekstraksi DNA *Escherichia coli* diperoleh dalam jumlah yang lebih banyak.

Sedangkan tanpa pemberian konsentrasi *celite* (sebagai kontrol) nomor 1 sampai 3 tidak terlihat adanya pita DNA, hal ini disebabkan karena pada sampel tidak ada penambahan *celite* pada reagen sehingga DNA hasil lisis akan habis tercuci selama proses preparasi ekstrak sel. Boom *et.al* (1990) mengatakan bahwa setelah proses lisis DNA akan bergabung

dengan partikel *celite* (diatom) yang merupakan bahan pengikat DNA.

Secara kuantitas, konsentrasi DNA *Escherichia coli* dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer. Nilai masing-masing konsentrasi isolasi DNA *Escherichia coli* pada 3 variasi konsentrasi *celite* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai konsentrasi Isolasi DNA *Escherichia coli*

No	Konsentrasi <i>celite</i> (µg)	Nilai OD A ₂₆₀ (nm)	Konsentrasi DNA (µg/ µl)
1	Tanpa <i>celite</i>	0,193	0,009
2	10 µl	0,639	0,032
3	20 µl	0,149	0,075
4	30 µl	0,832	0,042

Pada Tabel 1 terlihat bahwa terdapat variasi konsentrasi DNA tiap sampel yang diberikan *celite* dengan konsentrasi berbeda. Konsentrasi DNA yang paling rendah adalah tanpa *celite*, dan yang tertinggi dengan pemberian konsentrasi *celite* 20 µl dan diperoleh

konsentrasi DNA sebesar 0,075 µg/ µl. Ini menunjukkan banyaknya DNA yang terdapat dalam larutan sampel dan mampu seluruhnya terikat dalam konsentrasi 20 µl *celite* yang diberikan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Boom *et al* (1990) yang menggunakan 20 µl *celite* pada proses isolasi DNA.

Pada pemberian konsentrasi *celite* 30 µl, menunjukkan konsentrasi DNA yang lebih rendah dibanding konsentrasi 20 µl *celite*. Berbeda dengan pendapat Kolk (1996) yang mengatakan bahwa dengan meningkatkan volume *celite*, maka mampu menghasilkan lebih banyak ekstrak DNA. Namun jika dalam sampel suspensi bakteri terdapat DNA dalam jumlah sedikit, maka DNA yang akan terikat pada *celite* juga sedikit. Dalam penelitian ini, dengan peningkatan konsentrasi *celite* menjadi 30 µl konsentrasi DNA menjadi turun yaitu 0,042 µg/µl. Hal ini disebabkan karena perbandingan antara jumlah DNA yang terdapat didalam sampel tidak sebanding dengan jumlah konsentrasi *celite*.

Sedangkan sampel tanpa *celite* menunjukkan nilai konsentrasi 0,0096 µg/µl, namun pada hasil elektroforesis tidak menampilkan adanya pita DNA. Adanya nilai konsentrasi yang tercatat pada spektrofotometer disebabkan karena prinsip penggunaan spektrofotometer adalah berdasarkan intensitas cahaya yang diserap, walaupun itu hanya larutan. Jadi nilai konsentrasi DNA yang terukur merupakan larutan sisa pencucian pada proses ekstraksi DNA.

4. KESIMPULAN

Konsentrasi *celite* (diatom) yang sesuai untuk isolasi DNA *Escherichia coli* adalah 20 µl yang menghasilkan

konsentrasi DNA yang paling tinggi sebesar 0,075 µg/ µl.

DAFTAR PUSTAKA

- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Van Dillen PMEW, Van Der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(3):495-503.
- Brown TA. 1991. *Pengantar Kloning Gene*. Yogyakarta: Yayasan Essentia Medika.
- Gembong T. 1989. *Taksonomi Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Kolk AHJ, Kox LFF, Van Leeuwen J, Knipper S. 1996. *PCR Assay for Mycobacterium tuberculosis Complex and other Mycobacteria*. A Department Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands.
- Lefond SJ. 1975. *Industrial Minerals and Rocks. Fouth Edition*. New york: American Institute of Mining Metalurgical and Petroleum Engineerers, Inc.
- Manurung MS. 1994. *Studi Pemanfaatan Diatomea Aktif Sebagai Penyerap Ion pada Proses Pengolahan Air Limbah Pabrik Tekstil*. Medan.
- Matovic B, Saponjic A, Devecerski A, Miljkovic. 2007. Fabrication of SiC by carbothermal-reduction reaction of diatomaceous earth. *Journal of Material Science*. 42:5448-5451.

